

BEST AVAILABLE COPY

⑨ 日本国特許庁 (J P)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭63-137750

⑪ Int. Cl. 4

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和63年(1988)6月9日

B 01 J 20/22
20/32
31/06

D-6939-4G
Z-6939-4G
Z-7158-4G※

審査請求 有 発明の数 3 (全13頁)

⑭ 発明の名称 立体的に保護され、安定、共有結合したオルガノシランフィルムを有する基体

⑮ 特 願 昭62-240575

⑯ 出 願 昭62(1987)9月25日

優先権主張 ⑰ 1986年11月28日 ⑱ 米国 (U S) ⑲ 936,084

⑳ 発 明 者 ジョセフ・ルイス・グ アメリカ合衆国、デラウェア州 19808, ウイルミントン、ヘイロフト・サークル 16

㉑ 発 明 者 ジョセフ・ジャック・アメリカ合衆国、デラウェア州 19803, ウイルミントン、ウエイクロス・ロード 318

㉒ 出 願 人 イー・アイ・デュボ アメリカ合衆国、デラウェア州、ウイルミントン、マーケ
ン・ドウ・ヌムール・ツト・ストリート 1007
アンド・カンパニー

㉓ 代 理 人 弁理士 鈴江 武彦 外2名
最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

立体的に保護され、安定、共有結合した
オルガノシランフィルムを有する基体

2. 特許請求の範囲

(1) 基体と、2つの立体保護基 R と付加官能基 R₁ を含み、前記基体に共有結合し、以下の構造を有する一官能性シランを包含する安定支持体構造。

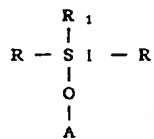


表 面

式中、R = イソプロピル、t-ブチル、sec-ブチル、sec-ペンチル、イソペンチル、またはシクロヘキシル、R₁ = アルカン、置換アルカン、アルケン、置換アルケン、アリール、または置換アリール；および A = シランが結合している基体

の表面基。

(2) 基体は水和金属酸化物、水和メタロイド酸化物、または有機重合体である特許請求の範囲第1項記載の支持体構造。

(3) 基体は適用された応力下で変動し少なくとも200℃の反応温度に対して安定しているプラスチックを有する特許請求の範囲第2項記載の支持体構造。

(4) 酸化金属と酸化メタロイド基体はシリカ、クロミア、および酸化スズを含む特許請求の範囲第2項記載の支持体構造。

(5) 基体はシリカで被覆された硬質物質である特許請求の範囲第2項記載の支持体構造。

(6) 保護基は基体に結合したシランの加水分解的に不安定な-Si-O-基の周囲で密接に充填して使用中この結合を保護することができる特許請求の範囲第1項記載の支持体構造。

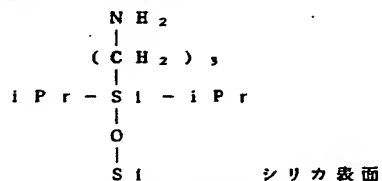
(7) 保護基は基体に結合したシランの加水分解的に不安定な-Si-O-基の周囲で密接に充填し使用中この結合を保護することができる特許請求の範囲第1項記載の支持体構造。

特開昭63-137750 (2)

求の範囲第2項記載の支持体構造。

(8) R基は異なるものである特許請求の範囲第7項記載の支持体構造。

(9) シリカ基体と、以下の構造を有するシリカ表面に共有結合したシランを包含するペプチド合成物のための安定支持体構造。



(10) $\text{R}_1 = \text{CH} = \text{CH}_2$ である特許請求の範囲第1項記載の支持体構造。

(11) クロマトグラフィ支持体としての特許請求の範囲第1項記載の構造の使用。

(12) R^- 基はイオン交換基を含む特許請求の範囲第1項記載の支持体構造。

(13) R^- 基は親和性クロマトグラフィで有用な配位子の結合位置を含む特許請求の範囲第1項記載の支持体構造。

とも2つの立体保護基を有する一官能性シランが共有結合している水和した酸化金属または酸化メタロイド、または固体有機重合体基体を包含する新規安定支持体構造に関する。本発明はまた、この様な支持体構造の製造方法に関する。本発明の生成物および方法は、多種の分野で使用される：すなわち、分析および大規模の単離のためのクロマトグラフィ分離の効果的で非常に安定したバックリング；親和性クロマトグラフィ分離のための安定した選択的媒質；液相反応の高選択性触媒；ペプチド、タンパク質、およびオリゴヌクレオチドの固相合成；ペプチドおよびヌクレオチド合成装置の安定した効果的マトリクス；およびペプチドおよびタンパク質配列の高選択性相に使用される。

〔発明の背景〕

R. E. Majors (High-performance Liquid Chromatography, Advances and Perspectives, 第1巻, C. Horvath著, Academic Press社, 1980年80-84頁) は、通常に使用された

(14) R^- 基は触媒の結合位置を包含する特許請求の範囲第1項記載の支持体構造。

(15) R^- 基は逆相クロマトグラフィに対して安定した疎水性結合位置を与える特許請求の範囲第1項記載の支持体構造。

(16) R^- 基はサイズ排除クロマトグラフィで使用するのに適した親和性位置を与える特許請求の範囲第1項記載の支持体構造。

(17) イオン交換基は弱アニオン-交換、強アニオン-交換、弱カチオン-交換または強カチオン-交換基である特許請求の範囲第12項記載の支持体構造。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は、立体的に保護する一官能性シランで被覆した基体を包含する独特の安定支持体構造に関する。この構造は、シランの硅素原子に結合した少なくとも2つの一官能性シランが供給結合した適当な反応性固体からなる。

本発明は、シランの硅素原子に結合した少なく

単分子層、一官能性結合相シリカを説明する。これら結合相シリカはクロマトグラフィで使用され、立体保護基を使用せずに広範囲の操作条件に対して安定性である材料を生成する。米国特許第3, 722, 181号明細書および第3, 795, 313号明細書(J. J. Kirkland および P. C. Yates) は二または三官能性シランから調製された重合性静止相でのクロマトグラフィバックリング生成物とその方法に関し、表面は立体的に保護された一官能性シランを持たない。西ドイツ国特許DE第2, 605, 789号明細書(J. H. Knox および A. Pryde) は、シリカ支持体をトリメチル-またはトリエチル-シラン基と反応させることによって調製された液体クロマトグラフィの結合相材料を説明するが、特別な立体保護基を使用しなかった。Lindgren等(J. Chromatogr. 第296巻, 1984年83-95) もまたトリエチルクロロシランを含む単一または混合一官能性シランから調製された材料に対して立体保護基を使用しなかった。K. K.

特開昭63-137750 (3)

Unger等〔J. Chromatogr. 第125巻、1976年、115-127〕はジフェニルシリル-、トリフェニルシリル-、およびn-ブチルジフェニルシリル-基を有する結合相材料のクロマトグラフィのための合成を開示する。平面フェニル基は非常に安定した効果的クロマトグラフィ パッキングを生成するのに必要な立体保護を与えない。

有機合成における可溶性化合物のある官能基を保護するオルガノシリコン試薬については、Lalonde等〔Synthesis、第9巻、1985年、817〕によって説明される。Corey等〔Tetrahedron Letters、第22巻、3455、1981年〕はトリイソプロピル-シリル ヒドロキシル保護基が結合しているシリコン原子およびシリコンに結合した原子の強い立体選別を行なうとしてトリイソプロピル-シリル ヒドロキシル保護基を説明する。これはトリメチルシリルまたはトリエチルシリル保護基とは対照的である。トリイソプロピルシリル基は固体基体には使用されなかった。Poole等〔J. Chromatogr. 第18

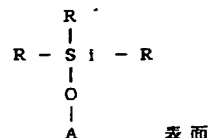
7巻、1980年、331頁、40〕は、加水分解的に安定性のアルキルシリル誘導体の形成に、試薬、t-ブチルペンタフルオロフェニルメチルクロロシランを使用した。固体基体は使用せず、この場合シラン試薬上には唯一の立体保護基が存在した。米国特許第4,478,952号明細書(M. P. Mack および C. T. Berge)は、オレフィン重合の可溶性支持触媒としてTi(OSi(イソプロピル)₃)を説明する。基体との共有結合はなかった。

Szabo等〔Helvetica Chimica Acta、第67巻、1984年、2128〕はヒュームドリカの表面へのジメチルネオペンチルシランのグラフト化を開示する。単一のネオペンチル基を使用しても高安定性パッキングを行なうのに必要な立体保護は得られない。R₃SiCl〔R=メチル、エチル、プロピル(イソプロピルではない)〕を使用するシリカとのシラン反応の使用は、Drago等〔Inorg. Chem. 第24巻、1985年、1983〕によって説明された。本発明で使用さ

れたタイプの立体保護基は使用されなかった。前記文献には本発明の特性である材料または方法を開示するものはない。

発明の概要

本発明は、2つの立体保護基Rと付加官能基R'を有し以下の構成を有する一官能性シランが結合している基体を包含する安定支持体構造を含む。



式中、R=イソプロピル、t-ブチル、sec-ブチル、sec-ペンチル、イソペンチル、またはシクロヘキシル；R'=アルカン、置換アルカン、アルケン、置換アルケン、アリール、または置換アリール；A=シランが共有結合されている基体の表面基。立体保護R-基はこれら支持体構造に高い安定性を付与する。

好ましい実施例の詳細な説明

発明の使用法

発明の概要で説明された本発明の新規安定支持体構造はクロマトグラフィ分離のための新規な効果的な安定性^の高い媒質を構成する。それらは特に様々な生物学的高分子を分離するために高性能液体クロマトグラフィ(HPLC)パッキングとして有用であるが、特にこれら化合物はpH<3のトリフルオロ酢酸を含有するようなアグレッシブな移動相で扱わなければならないものである。本発明の支持体構造はこのようなアグレッシブな環境でさらに安定した大きさの程度であり得、一方最適滞留およびカラム効果の条件を提供する。このような特性は混合物の再現性のある分析に所望であるが、精製化合物の大規模または処理スケールの単離には特に重要である。本発明の支持体構造はこの様な単離における有機静止相の過渡の“ブリーディング”を示す特性があり、その結果、“ブリーディング”またはカラム分解工程の要素で単離生成物が汚染される現在のHPLCカラムパッキングとは対照的である。それ故、本発明の

特開昭63-137750 (4)

新規生成物は、逆および正常相クロマトグラフィ、イオン交換クロマトグラフィ、サイズ排除クロマトグラフィ、および疎水性相互作用クロマトグラフィによる非常に優れたHPLC分離を可能にする。

本発明の物質のクロマトグラフィは文献(W. R. Melander および C. Horvath, "High Performance Liquid Chromatography", 第2巻, C. Horvath著, Academic Press社, New York, 1980年)の139頁で説明されたクロマトグラフィパッキングの"エンドキャッピング"工程で特に使用される。このアプローチでは、トリメチルクロロシランを典型的に使用してシラン化反応後に活性残留シラノール基を"キャップオフ"し望ましくない吸着工程を減少させパッキングのパッチ対パッチの再現性を改良する。本発明で使用された立体的に保護されたシラン、特にトリイソプロピルクロロシランのようなシランは安定"エンドキャップ"生成物を生成し、長期間に亘る使用に対して再現性を改良する。

注素質または他のセラミック支持体に共有結合される。

本発明はまた、ペプチド、タンパク質、およびオリゴヌクレオチドの固相合成のための安定支持体構造の使用である。これらで使用された物質は比較的寿命が短く、結果として再現性に問題が生じ、合成工程で使用された媒質を頻繁に取替える必要がある。本発明の新規構造はペプチド、タンパク質、およびヌクレオチド合成装置で安定した効果的媒質として特に効果的であり、この技術に関係した現存する問題を緩和する。

本発明の新規支持体構造は特異結合によって特性化技術に大きな進歩を及ぼす。最適固体表面に共有結合した安定した効果的で選択性の高い有機質含有相の使用はペプチドとタンパク質配列の方法論を改良する。本発明の支持体構造は特異結合分析に使用された表面反応に対する媒質として作用する物質の化学的および物理的特性の両方を最適化する手段を提供する。

基体

本発明はまた親和性クロマトグラフィでも使用される。本発明の支持体構造は安定した効果的媒質上での親和性分離を可能にする。生物学的に活性の共有結合親和性交換基の使用における厳しい制限の一つは使用中パッキングからのこの配位子の連続的損失または"ブリード"である。この工程の結果、媒質を分離する付加能力が減少し、収率も減少する。さらに、"ブリーディング"配位子は精製生成物を非常に汚染することがある。本発明の新規構造は力の所望のメカニカル特性と最適孔サイズを有するシリカ支持体上での親和性分離を可能にし、使用中結合配位子の損失が非常に減少する。これによって分離媒質の寿命が非常に増加し最後の精製生成物の汚染の可能性が減少する。

本発明の生成物は、液相反応のための触媒として有用である。選択性が高い有機およびオルガノ金属配位子は、前記親和性物質にして説明されたような所望の寿命と効果的特性を有する安定した活性触媒を生成するのに最適の機械特性を有する

本発明の基体は液体または気体から区別できるような固体である。1つの実施例では、酸化金属または酸化メタロイドであり得るが、明確な適用応力下で流動する有機重合体またはプラスチックであり得る。新規組成物の最も有用な実施例では、基体は少なくとも20℃の反応温度で安定している。

基体は以下で説明されるシラン試薬と反応する表面を有しなければならない。例えば、シリカまたはクロミアのような硬質無機固体は加水分解され、表面-OH基はシラン試薬と反応するために利用できる。選択的に、これら材料の表面はシランとの反応を可能にする他の適切な基で代用することができる。例えば、注意深く乾燥したシリカの表面はシリコンテトラクロライドまたは塩化チオニルで塩素化できる。次いでこの塩素化表面を反応性Si-HまたはSi-OH基を含むシラン試薬と反応させ、本発明の支持体基体を調製することができる。好ましい酸化金属または酸化メタロイド基体はシリカ(最も好ましい)、クロミ

特開昭63-137750 (5)

ア、および酸化スズを含むが、このような種類の他の基体でもよい。

適切な酸化金属または酸化メタロイドフィルムで硬質表面を被覆した後、前記適切な酸化金属または酸化メタロイドを適切なシラン試薬と反応させることが望ましい。例えば、文献 [Iler ("The Chemistry of Silica " , John Wileyおよび Sons , New York , 1979年 86頁)] によって説明された方法によってシリカの薄いフィルムでチタニアを被覆することができる。次いでこのシリカの薄い被覆を必要であれば加水分解し、適切なシラン試薬と反応させることができる。

シラン試薬

本発明のユニークな生成物を調製するのに使用されるシランは一官能性であり、シランの珪素原子に結合した2つの立体保護基を含まなければならない。このように、本発明で実施されるシランは以下の構造を有する。



式中、R = イソプロピル、t-ブチル、sec.ブチル、イソ-ブチル、sec.ペンチル、イソ-ペンチル、およびシクロヘキシル；R' = アルカン、置換アルカン、アルケン、置換アルケン、アリール、または置換アリール；およびX = ハロゲン、アルコキシ、シロキシ等の反応基である。便宜上、これらシランは立体保護シランと呼ぶ。

本発明で使用されるシランはシランを固体基体に結合する-Si-O基に独自の立体保護を与えるR-基を有しなければならない。メチルまたはエチルのような非常に小さい基は所望の立体保護を与えない。n-ブチル、n-ペンチル、またはn-ヘキシルのような大きい直鎖官能性は本発明の特許請求の範囲内にあるシラン剤の保護レベルに達しない。フェニルまたは置換フェニル基はその平面構造が表面に結合したシラン

に所望の立体保護を与えられないために望ましくない。

大きいバルキーシランは低収率でのみ基体表面と反応し（表面上の立体混雑のために）一般に調製コストが高いために特に望ましくない。また、これら大きいバルキー基によって示された高レベルの疎水性が非常に有害である場合もある。例えば、n-オクチルのようなR基は疎水位置を実質的に含まないバックリングを必要とする水性のサイズ排除液体クロマトグラフィーで望ましくない吸着滞留を発生する重要な疎水性相互反応（逆相効果）を示す。

好ましい一官能性シランは、イソプロピル、t-ブチル、sec.ブチル、イソ-ブチル、sec.ペンチル、イソペンチル、およびシクロヘキシルであるR基を有する。これら基は一般に、最高レベルの立体保護を与え、最も便利で調製コストが低く、最も望ましい末端用途特性を示す。これら基の独特の特性は、これら基の構造のために、基体に結合したシランの加水分解的に不安定

な-Si-O基の周囲で密接に充填する（またはホールドする）ことができ、使用中加水分解的分解に影響されやすい結合を保護することができるという事実に基づいている。この密接に充填した構造のために、これら好ましい基は、驚くべきことに、例えばある形態のクロマトグラフィーで有害である強い疎水効果を示さない。

好ましいシランは、立体保護R基がイソプロピル、t-ブチル、およびsec.ブチルであるものである。これらシランは最高レベルの立体保護を与え、一般に調製コストは最低である。特に好ましいシランは、高レベルの保護を与え一般に調製コストが最も低く、また他の効果的立体保護基に関して疎水性が最も低いイソプロピル基を有するものである。立体保護基が大きくバルキーであれば、基体とのシランの反応は困難になる。このように、t-ブチル基は優れた保護成分であり、基体とのt-ブチルシランの反応はゆっくりであり時として表面の被覆が悪い。2つの保護t-ブチル基を有するシランもまた製造が困難で

特開昭63-137750 (6)

ある。

表面の被覆は不完全であっても、本発明の立体保護基を有する物質は優れた安定性と実用性を示す。このように、あまり完全ではない被覆を有する支持体構造は、“立体的混雑”のために、または反応にはシラン反応体が故意に不足しているために、表面が完全に反応している基体によって得られた安定性のレベルを示す。この発見は、部分的被覆の代りに官能基の高密度（完全に反応した）単層が安定した物質を得るために必要である [K. K. Unger等], Chromatogr. 第125巻、1976年、115を参照] という一般に受容されている原理とは矛盾するものである。優れた安定性は本発明に含まれる立体保護基による。

本発明のシラン内の結素原子は多官能性であってはならない、つまり、 $-SiX_2$ または $-SiX_3$ (X = ハロゲン、アルコキシ、シロキシ等のような反応基) のような試薬は反応中、または使用中に重合しやすく（それ自体で反応するまたは他のシラン分子と反応する）、異なる化

学的物理的特性を有する非再現性表面が生じるために、一官能性 $-SiX$ でなければならない。 $-SiX_2$ または $-SiX_3$ であってはならない。高度の再現性は滞留反復が臨界的要因であるクロマトグラフィの使用には特に重要である。多官能性シランもまた表面と部分的にのみ反応し、扱われる物質と望ましくない反応を最終的に受ける反応基を残す。選択的に、これら残留反応基は関心のある物質と有害に相互作用しうる酸性シラノールに加水分解させ得る。他方、本発明で使用される一官能性シランは1構成でのみ反応し、既知の構造の再現可能な表面が生じる。

本発明の支持体構造を調製するのに使用されたシランは意図された応用に適した様々な官能基 R^* を含むことができる。例えば、“Introduction to Modern Liquid Chromatography” (L. R. Snyder および J. J. Kirkland、John Wiley および Sons、New York、1979年) の第7章で説明された方法で行われた逆相クロマトグラフィでは、

シランの R^* は生じる滞留の所望の疎水性相互作用を可能にするのに C_3 、 C_4 、 $n-C_8$ 、 $n-C_{18}$ のようなアルキルまたはアリール基よりなることが望ましい。イオン交換クロマトグラフィには、 R^* 基はイオン交換作用を有する基、例えば、アニオン交換体として $-(CH_2)_3-N^+(CH_3)_3-$ 、およびカチオン交換体として $-(CH_2)_3-C_6H_4-SO_3H$ を有する基を含むことができる。サイズ排除クロマトグラフィで、タンパク質のような極性の高い、水溶性バイオ高分子の分離には特に、基体表面を $-(CH_2)_3-O-CH(OH)-CH_2OH$ のような極性の高い R^* 基、いわゆる“ジオール”作用で変性される。疎水性相互作用クロマトグラフィには、基体上には弱疎水性静止相が望まれる。例えば、 R^* = メチル、エチル、 n -プロピル、またはイソプロピルはこのモードのクロマトグラフィ滞留に必要な最適な疎水性相互作用を与える。通常相のクロマトグラフィの場合、極性官能基は R^* 基として、例えば

$-(CH_2)_3-NH_2$ および $-(CH_2)_3-CN$ がシランに導入される。

親和性クロマトグラフィ支持体構造には、基体をまず $-(CH_2)_3-NH_2$ のような適当な反応性 R^* 基を有する一官能性シランと反応させる。次いでこれら基を特異生物学的活性の配位子とさらに反応させ、所望の分離を行なうのに必要な親和性支持体構造を生成する。 R^* がエポキシイド基を有する場合、タンパク質またはペプチド (RNH_2) のアミノ末端は直接反応によって結合し以下のタイプの構造を形成することができる：
 $-CH(OH)-CH_2-NHR$
 エポキシイドをまず加水分解し、“ジオール”基を形成し、次いで多種の他の試薬で活性化することができる。

立体的に保護された一官能性シラン試薬を使用して液相反応のための触媒として使用する支持体構造を調製する。酸または塩基性触媒として使用する場合、強酸性スルホン酸基または強塩基性第四級アミン基を前記イオン交換クロマトグラフ

特開昭63-137750 (7)

ィバックングで説明した方法でシラン構造に導入することができる。白金およびパラジウムのような金属含有配位子をイオンとしてまたはオルガノ金属コンプレックスとして酸化または還元による選択触媒に対して本発明の支持体構造にビルトできる。

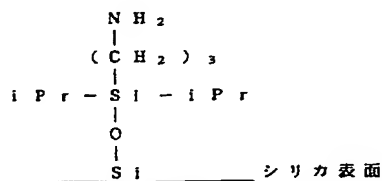
本発明の支持体構造を合成オリゴヌクレオチドおよびペプチドの調製におけるような固相合成技術で使用する事ができる。この場合、結合された活性化されたシランに個々のヌクレオチドまたはアミノ酸を繰返し付加することによって合成が行われ、通常5乃至50ユニットの長さの所望の最終生成物を調製することができる。これら合成の成功は多数の要因に依存するが、その一つは活性化基を含有するシランを結合する基体とシランとの結合の化学的安定性である。

オリゴヌクレオチド合成には、アミノプロピルシリル変性基体で通常開始し、アミノプロピルサクシンアミド結合を介して4つのジメトキシトリチルヌクレオチドの一つを結合させる。所

望の付加塩基はフォスホラマイト合成ルートを通して付加される。この様なアプローチはE. Ohtsuka等によって報告された[Nucleic Acids Research 第10巻(21)1982年6553]。

J. M. Stewart等("Solid Phase Peptide Syntheses" Pierce Chemical Co., 1984年)によって説明されたように固相ペプチド合成には様々なカップリング方法が使用される。最も広く使用されるアプローチは結合ベンジルエステルまたはアシロキシメチルフェニルアセトアミドメチル(いわゆるPAM)結合のいずれかを有する基体で開始する。各連続アミノ酸の付加は次のアミノ酸のカルボキシル基に対してシランに結合されたアミノ基との反応によって生じる。

これら従来の支持体は本発明の新規安定支持体と取替えることができる。この様な場合の好ましい安定支持体構造は以下の構造を有する。



ペプチドとタンパク質の配列では、配列される化合物は通常ポリブレン、重合体第四級アミン(Sigma Chemical社から市販されている)のような塩基性物質の物理的に維持された被覆を有する反応器フィルタディスク上でまず予め吸着される。この塩基性重合体はペプチドまたはタンパク質を反応器ディスク上に保持し、Edman chemistryによってアミノ末端からの反復化学分解を可能にする("Method of Peptide and Protein Microcharacterization - A Practical Handbook" J. E. Shively著、Humana Press, Clifton, N.J., 1986年を参照)。この反復操作中に発生する現在の技術の大きな欠点は、定量以下であることであり、それは、部分的に"洗浄"または配列中のディスクか

らの重合体の損失によるものである。ディスクからのこの重合体の損失は決定できる配列の長さを制限する。

本発明の安定した共有結合第四級アミン、立体保護された本発明の支持体構造は、シラン化反応ディスクまたはシラン変性粒子の薄い床から配列操作の優れた手段を提供する。相互作用官能基はシラン分子のR'基として導入される。この場合、本発明で使用するR-基は基体に結合している-Si-O-結合を立体的に保護する。イソプロピル、sec-ブチル、およびt-ブチル基はこの点で特に効果的である。

本発明で使われたシランのR-およびR'基は同一である必要はない。例えば、R-イソプロピルは加水分解に対するシランの安定化を助け、R'-C18は逆相クロマトグラフィに対する静止相に強い疎水特性を与える。RおよびR'基の適切な操作によって、タンパク質のような生物学的分子を静止相が変性(配座的変化)する傾向を最小にする液体クロマトグラフィの物質調製が可

特開昭63-137750 (8)

能になる。

シランのR'基を選択して次の反応を所望の特性を有する支持体構造を調製するのに使用できる。例えば、 $R' = -CH=CH_2$ はアクリロニトリルのような他の不飽和単量体または重合体と結合されたシランとの交叉結合を可能にする官能性を与え構造上にニトリル基またはポリビニルピロリドンを生じ、極性の高い重合体表面を生じさせる。このような重合/交叉結合反応は過酸化物のような通常のフリーラジカル開始剤を使用して行なわれる、またはSchomburg等によって説明された高エネルギー放射線によって開始される[J. Chromatogr., 第351巻、1986年、393]。

反応

基体との立体保護シランの反応は様々な条件下で行われる。シランの十分な蒸気圧が発生すれば気相で反応を行なうことができる。上昇温度が必要な場合もある。通常、反応は適切な乾燥有機溶剤中で行われるが、時として適切な触媒または酸

に使用され、実際の過剰程度は反応速度に依存する。早い反応には反応する基体表面原子のモルを基準にした、20-50%当量過剰のみが必要であり、遅い反応には便利な反応時間で所望の共有結合基を高収率で生成するのに2-10-倍当量過剰が必要である。

酸受容体または触媒はハローシランの反応で望ましく、反応速度を非常に増し、所望の結合相の収率を改良する。シリカのシラン化における塩基性酸受容体と溶剤の役割はKinkel等[J. Chromatogr., 第316巻、1984年、193]によって説明される。これら酸受容体塩基の作用態様は前記文献で説明される。典型的酸受容体にはピリジン、トリエチルアミン、2、6-ルチジン、およびイミダゾールがある。これら求核化合物は通常使用されるシランの量に対して過剰（例えば2倍当量）で反応体に添加される。しかしながら、基体とシランの反応速度は、酸受容体の濃度が大きいと基体表面上のこの物質の吸着が反応性シランの接近を抑制する傾向があるた

受容体の存在下で行われることもある。最後に、必要であれば反応速度を上げるために上昇温度で、“ニートな”シラン液体で行なうこともある。クロマトグラフィ支持体の表面とのシランの反応は“An Introduction to Modern Liquid Chromatography” (L. R. Snyder および J. J. Kirkland、John Wiley および Sons、New York、1979年)の第7章で説明される。多孔性シリカとシランとの反応は、“Porous Silica” (K. K. Unger、Elsevier Scientific Publishing社、New York 1979年)の108頁でさらに説明される。多量の物質とのシランの反応は、“Chemistry and Technology of Silicones” (W. Noil、Academic Press、New York、1968年)で説明される。

好ましいアプローチは適切な溶剤中で反応を行なうことである。ハローシランの場合、適切な乾燥有機溶剤中で上昇温度でまたは溶剤の沸点で通常反応が行われる。過剰のシランが典型的に反応

めに遅くなることが明らかとなっている。

溶剤それ自体は本発明のシランの反応で重要な役割を有する。一官能性シランの場合、前記ルイス酸およびルイス塩基性の両方を有するシランは反応を助長するということがKinkel等によって説明された。立体保護シランとのこのような関係はまた確立していない。

反応は、酸受容体としてピリジンと過流トルエンまたはキシレン中で立体保護ハローシランで行うことができる。溶剤を注意深く乾燥してシランの加水分解を阻止し、窒素のような乾燥不活性気体のブランケット下で反応が行われる。使用されるシランによっては、この方法で行われた反応は平衡条件が得られるまで3-4日必要である。

ジクロロメタン、アセトニトリル、およびN、N-ジメチルホルムアルデヒド中の反応は、イミダゾールおよびトリアゾールのような塩基を酸受容体として使用する場合に特に効果的である。明らかに、これら求核はオルガノハロシランによる中間体を形成することができ、生じた求核配位は

特開昭63-137750 (9)

Si-X結合を長くし、基体表面の攻撃を増大する。

アミノおよびトリフルオロアセトキシシランのような高反応性シランはハローシランより早く珪素質基体と反応するが、次の配位子の収率は反応が完了する時間に匹敵する。トリフルオロアセトキシシランはCorey等 [Tetrahedron Lett. 第22巻、1981年、3455] によって説明された方法によってジクロロメタン中で酸受容体として2、6-ルチジンと反応する。

アルコキシシランは、ハロー、アミノおよび他のアグレッシブなシランよりいくらかゆっくりと基体と反応する。結果として、これら反応はいくらか異なる方法によって行われる。珪素質基体をシラン化する好ましい方法は、蒸溜ヘッドを備えたフラスコ中に基体を入れ、キシレン（またはトルエン）を添加し、加熱して還流する。低沸点共沸混合物が取除かれる。この段階は、次のシラン化が所望の方法で進行することを保証するようにシステムを非常に乾燥した状態に置く。次の

でアルコキシシランをフラスコ〔ニートにまたは乾燥キシレン（またはトルエン）中で〕に添加し、フラスコの内容物を再び加熱して還流する。この点で、アルコキシシランと基体との反応からアルコールが形成される結果として、低沸点の共沸混合物が再び現われる。低沸点共沸混合物は沸点が精製キシレン（またはトルエン）の沸点となり反応の完了を示すまで還流オーバーヘッドから連続的に（または段階的に）取除かれる。概して、珪素質基体を有するアルコキシシランの反応体は酸受容性触媒の添加を必要としないが、温和な塩基性触媒が有利となることもある。

ヒドロキシル化基体とヒドロキシシランとの反応は、反応生成物としての水の形成を伴って進行する。従って、反応混合物から水を取除くような反応条件が使用され、反応を完了させる。この場合、低沸点共沸混合物を生成する反応溶剤を使用する。この共沸混合物は前記アルコキシシランと同じ方法で取除かれる。反応条件は注意深く制御しなければならない。そうでなければ、ヒドロキ

シシランはそれ自体で反応するかまたは重合し、望ましくない反応生成物を生じる。重合体の形成を最小にする1方法は、ヒドロキシシランの濃度を比較的低いレベルに維持し、それ自体ではなくむしろ基体とのヒドロキシシランの反応を助長することである。このアプローチでは、反応は化学量論量以下のヒドロキシシランで開始し、次いで反応の完了に必要な追加シランを反応中に添加することができる。

有機ヒドロキシル化重合体との立体保護シランの反応は、溶剤の選択と反応条件を有機重合体の特性を考慮して調節しなければならないという以外は珪素質基体と同じように進行する。必要な条件の例にはセファロース4B、ヒドロキシル化有機重合体とガンマーグリシドキシプロピルトリメトキシシランとの反応についてのS. Hjertén等 [J. Chromatogr. 第354巻、1986年、203] によるものがある。

他のタイプの基体と立体保護シランとの反応は異なる方法で進行し、反応アプローチにおける修

正が必要である。例えば、ヒドロキシル化二酸化クロムはハロシランとほとんど反応を示さないかまたはまったく反応しない。しかしながら、この様な材料は、X-水素原子であるシランと容易に反応できる（例えば米国特許第3,939,137号明細書を参照）。選択的に、アルコキシシランはオランダ特許出願NL 75/14524号明細書、西ドイツ特許公開DE 2,459,766号明細書、および米国特許第4,177,317号明細書で説明された方法で二酸化クロムと反応する。

概して立体保護シランによる基体の完全な被覆が望ましい。被覆の程度は基体上の反応位置の数と基体の表面積の関数である。完全にシリカ表面をヒドロキシル化した場合、約8 μmol / mlの潜在的に反応性のSiOH基が表面に存在する。しかしながら、立体保護シランのR-およびR'-基に関連するバルクまたは立体効果のために、これらすべてのSiOH基は反応できない。クロロトリイソプロピルシランのような小さい反応体の

特開昭63-137750 (10)

場合、約 $1.3 \mu\text{mol} / \text{cm}^2$ のシランが表面に共有結合できる。立体的に大きいシランでは、濃度が低くなる。

しかしながら、基体表面を完全に被覆する必要はない。有機配位子の濃度が低いか中程度の表面が望ましいこともある。これを達成するには、反応は完全に反応した表面に生じる量に対して化学当量以下のシランで行われる。本発明の生成支持体構造は加水分解による分解に対して高い安定性を示す。

支持体構造の特徴

基体表面にシランを結合する $-\text{Si}-\text{O}-$ 結合を保護する好ましい R 基の能力は予測されなかったもので、本発明のユニークな特性を表わす。この驚くべき立体保護効果の例は第 1 図のデータによって示される。この図は、移動相の既知のカラム容量に対する勾配溶離の間のアグレッシブな水/アセトニトリル/トリフルオロ酢酸 ($\text{pH} = 2$) 移動相にカラムをさらした後の支持体構造に残った結合相の量 (基体上の有機シランの量の直接関

数としての 1-フェニルヘプタンに対する能力係数 k' 値によって測定される) を示す。第 1 図のプロットは、結合相の安定性がトリメチル-、トリ-n-プロピル-、からトリ-n-ヘキシル-への同一 R-および R'-基の鎖長が延びると共に増加することを示す。この一般的傾向は、シリカ基体にシランを結合する $-\text{Si}-\text{O}-$ 結合に対して立体保護をかなり与える R-および R'-基の増加したバルクまたはサイズによって予測される。しかしながら、イソプロピル-基によって与えられた分解からの非常に優れた立体保護は予測できない。イソプロピル-基の鎖長は n-ヘキシル-の鎖長より短いけれども、イソプロピル-R-基との結合相は分解に対して大きい抵抗を示す。この安定性の著しい増加は“混雑 (crowd)”とは異なるイソプロピル成分の特徴によるものであり、基体表面にシランを結合する $-\text{Si}-\text{O}-$ 基を効果的に被覆する。この被覆は影響されやすい $-\text{Si}-\text{O}-$ 結合へのプロトンまたはヒドロキシルイオンの接近を制限する。

本発明で好ましい他の R-基 (t-ブチル-、sec.ブチル-、イソブチル-、イソペンチル-、sec.ペンチル-、およびシクロヘキシル-) もまた加水分解による攻撃から影響されやすい $-\text{Si}-\text{O}-$ 基を保護する能力のために、ユニークな方法の同様の立体保護を与える。フェニル-のような平面 R-基は立体保護には比較的效果がなく、この様な基を有するシランは第 1 図のデータに使用されるような試験で比較的に急な分解を示す。n-プロピルおよび n-ヘキシル-のような短い直鎖基は本発明の立体保護基によって可能となる立体保護のレベルを与えない。

イソプロピル-R-基は、効果的立体保護基のうちで最も小さく、またコストが最も低いために最も好ましい。小さい基の明白な利点は生じる有害な相互作用に対して小さい表面積を示すことである。例えば、クロマトグラフィでは、イソプロピル-R-基は分解に対して良い立体保護を示し、最大疎水性相互作用 (例えばイオン-交換) に対して R'-基が構成される場合に望ましくない

疎水性相互作用 (いわゆる逆相効果) のレベルが最も低い。この場合、この様なイオン交換体は分離の間に静止相との望ましくない疎水性結合の結果としてタンパク質のような生物学的分子を分解する (配座の変化をもたらす) 静止相の傾向を最小にする。イソプロピル-R-基は所望の特性、使用法の便利さまた価格面で良い妥協点である。

支持体構造の特性

色素質生成物上の結合シランの構造は $29-\text{Si}$ および $13-\text{C}$ クロス-極性化マジック角度-スピン-核磁気共振分光分析法 (CP-MAS NMR) および拡散反射率赤外線フーリエ伝送分光分析法 (DRIFT) によって特性決定される。これら技術の 2 つの例とシランおよびシラン変性シリカを特性決定する使用は E. Bayer 等 (Chromatogr., 第 264 巻、1983 年、197-213) および J. Kohle 等 (J. Chromatogr., 第 352 巻、1986 年、275) に見出される。NMR による固体物質の特性決定では、信号のライン幅は、ダイポール-ダイポ

特開昭63-137750 (11)

ール相互作用と化学シフトテンサールの異方性のために増加する。ダイポール脱カップリングおよびマジック角成スピン技術によってスペクトルが構造中の多種の原子に割当てられる鋭い信号を示すことができる。13-C CPMS NMRでは、シリカ表面に結合したオルガノシランの炭素原子の同一性と配座について情報が得られる。基体が有機重合体である場合、シランに対する構造の割当ては困難である。29-Si CP-MAS NMRでは、多種のSi原子の方向と結合特性が割当てられる。

DRIFT分光分析法はシリカ変性表面のシラノールの存在または損失を識別するのに有用である。例えば、スペクトルの3700cm⁻¹の鋭いピークの消失と2800-3000cm⁻¹領域のピークの出現は隔離されたシラノールの損失とアルキル配位子による結合によるC-H構造の形成を示す。

例 1

トリイソプロピル結合相の調製および評価

次いで乾燥窒素雰囲気中に置いた。この固体基体に60mLの乾燥キシレン、390μLのピリジン、および5.2mLのトリイソプロピルクロロシラン(Cat. T2885番、Petrarch Systems、Bristol、PA)を添加した。この混合物を138℃で72時間、窒素バージ下で還流した。次いで懸濁体を冷却し、それぞれ300mLのトルエン、塩化メチレン、メタノール、50%のメタノール/水、およびアセトンで注意深く洗浄した。次いで物質を、まず60mLの新鮮なテトラヒドロフランで30分間還流し、次いで新鮮なアセトンで還流した。次いで物質を110℃で、真空(30in. Hg)で乾燥した。生成物の化学分析は1.3μmol/cm²の有機配位子の平均表面被覆に対応する0.49%の炭素の存在を示した。

ほぼ2gのこの支持体構造を、"Introduction to Modern Liquid Chromatography" (L. R. Snyder および J. J. Kirkland John Wiley および Sons N. Y.、1979年第5章)で説明された方法によって0.46×15cmのステン

7ミクロン粒徑で300Å孔の多孔性シリカ微球粒子はE. I. デュボン社(Wilmington DE)から市販されているZorbax PSM-300として得られた。この物質を、窒素吸着によって決定した34cm²/gの比表面積を有する完全に再ヒドロキシル化した物質を生成するための米国特許出願第798,332号明細書のJ. J. Kirkland および J. Kohlenの方法によって処理した。特に、使用された方法は、60gのPSM-300シリカを取り、600mLの水中75ppm HFをフラスコに添加し、100℃で72時間還流した。次いでシリカを1500mLの水、500mLのアセトンで洗浄し、真空(30in. Hg)下で一晩乾燥した。次いでシリカを570mLの水中に置き10時間沸騰させ、室温に冷却し、500mLのアセトンでろ過洗浄し、真空下(30in. Hg)で110℃で一晩乾燥した。

6グラムのこの物質を110℃で真空(30in. Hg)下で加熱し、吸着した水を除き、

レススチール管にスラリーを充填した。生成クロマトグラフィカラムは蒸留水中の0.1%のトリフルオロ酢酸(A)、およびアセトニトリル中の0.1%のトリフルオロ酢酸(B)よりなる交互イソクラチック勾配溶離溶剤システムを使用して試験した。溶剤を80分、0-100%Bにプログラムし、試験化合物として1-フェニルヘキサンを使用して50%Bでイソクラチック測定を行った。この移動相サイクルをカラム寿命研究中繰返した。

滞留時間の測定はカラムを通過した溶剤のカラム容量の数の関数として行われた。滞留時間の減少はカラムのパッキング物質からシラン結合相の直接的損失測定が行われた。第1図のデータはトリイソプロピル変性シリカがこれら実験の3500カラム容量の間(96時間)10%のみの損失を示したことを示すものである。これは同じ方法を使用して>90%、70%、および60%の損失を示した第1図に示されるようなトリメチル、トリ-n-プロピル、およびトリヘ

特開昭63-137750 (12)

キシルー変性シリカの結果と比較する。

これは大きいR-基を含む構造に比較しても本発明の新規支持体構造の優れた安定性を示す。

例2

トリイソプロピル結合相の調製および評価

E. I. デュポン社 (Wilmington, DE) から5ミクロンの粒径で60Å孔サイズの多孔性シリカ微球を得て、200 ppmのHF溶液を表面積の高いこのシリカに使用した以外は、例1で説明された方法によってヒドロキシル化した。4グラムのこの基体を真空(30 in. Hg)下で110℃で一晩加熱し、吸着水を除去、次いで乾燥室素雰囲気中に置いた。この固体に、40 mLの乾燥キシレン、1.55 mLのピリジン、および20.5 mLのトリイソプロピルクロロシラン (Cat. T2885番、Petrarch Systems, Bristol, PA) を添加した。反応と研究方法は例1と同じであり、生成物の化学分析は空素吸着によって測定された244 cm^3/g の比表面積を有するこのシリカ上の1.3 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$ の表面被覆に対応する

3.18%の炭素を示した。

物質の固体状態マジック角度スピン29-Si NMRはシリカ表面上のSi-R基に対して11.1 ppmで予測された単一共振ピークを示した。カラムを例1のように試験し、96時間の試験時間に亘って優れた安定性を示した。このカラムの作用はこの試験中5個のペプチド(ロイシン、エンケファリン、アンギオテンシンI、グルカゴン、インスリン、およびメリチン)を分離することによって評価された。第2図は、最初と最後の勾配溶離サイクル中に達成された分離を示す。

例3

例2のように乾燥した16グラムのシリカを乾燥室素雰囲気下に置き、これに128 mLのトルエン、32 mLのジメチルホルムアルデヒド、および5.2 gのイニダゾールを添加した。混合物を110℃の一定ヘッド温度に蒸留し水を共沸した。この乾燥混合物に16.7 mLの3-シアノプロピルジイソプロピルクロロシラン (Petrarch Systems, Bristol, PA) を添加

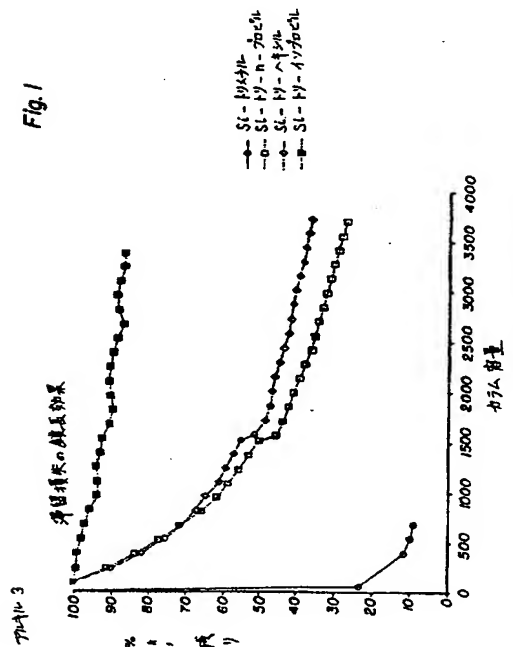
した。生成懸濁体を110℃で20時間還流した。次いで懸濁体を冷却しそれぞれ800 mLのトルエン、塩化メチレン、メタノール、50%のメタノール/水、およびアセトンで洗浄した。最終物質を真空下(30 in. Hg)で110℃で一晩乾燥した。支持体は例2のようにクロマトグラフィされた試験ペプチド混合物に対する予測されたレベルの滞留を示し、この様な分離で使用されたアグレッシブな移動相に優れた安定性を示した。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、異なるシラン結合相パッキング物質に対するカラムを通過した溶剤の異なるカラム容量の関数としての滞留時間のグラフであり、

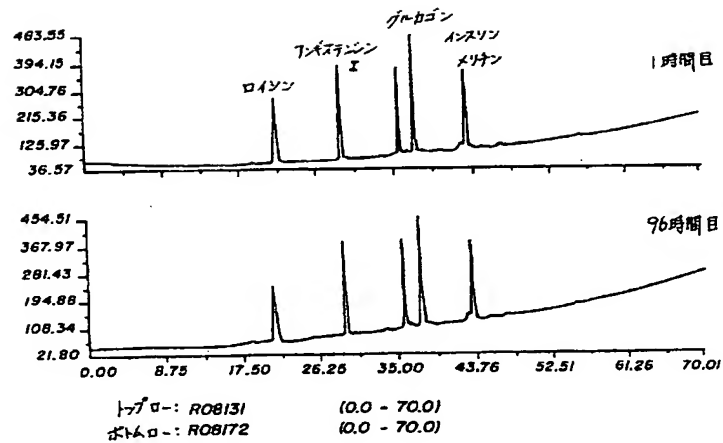
第2図は、トリイソプロピル結合相を使用した連続勾配溶離サイクルに亘る5個のペプチドの分離の結果を示す。

出願人代理人 弁理士 鈴江武彦



特開昭63-137750 (13)

Fig. 2



第1頁の続き

⑤Int. Cl. 4	識別記号	庁内整理番号
C 08 F 8/32	MHH	7167-4J
8/42	MHU	7167-4J
G 01 N 30/48	D-7621-2G	8318-4H
// C 07 K 3/20		8318-4H
17/08		8318-4H
17/14		

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.